Zur Physiologie des Wurzelpilzes von *Neottia Nidus avis* Rich. und einigen grünen Orchideen

---

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Philosophischen Fakultät der
Universität Basel

vorgelegt von

Heinrich Wolff
aus Basel

Leipzig
Verlag von Gebrüder Borntraeger
1926

Zur Physiologie des Wurzelpilzes von *Neottia Nidus avis* Rich. und einigen grünen Orchideen

---

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Philosophischen Fakultät der
Universität Basel

vorgelegt von

Heinrich Wolff
aus Basel

Leipzig
Verlag von Gebrüder Borntraeger
1926

Genehmigt von der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Abteilung der Philosophischen Fakultät auf Antrag der Herren Professoren Dr. G. Senn und H. Rupe.

Basel, den 15. Juni 1926.

Prof. Dr. H. Rupe,
Dekan.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Sonderabdruck aus Jahrbücher für wissenschaftl. Botanik. Bd. 66. Heft 1.
Gebrüder Borntraeger, Leipzig

Einleitung.

Bei seinen Untersuchungen über die Lageveränderungen der Chromatophoren von *Neottia Nidus avis* (1908, S. 191) und den sich daran anschließenden Studien über die Kohlensäureassimilation dieser Pflanze (1907 und 1925, S. 124 ff.) hatte sich meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof. G. Senn, die Frage aufgedrängt, woher diese braune Orchidee ihre Kohlehydrate beziehe, da sie trotz ihrer schwachen Assimilation viele große Stärkekörner enthält. Die Möglichkeit schien nicht ausgeschlossen, daß die Kohlehydrate wenigstens zum Teil aus dem Humus stammten, und daß bei ihrer Aufnahme der in den Wurzeln von *Neottia* lebende *Mycorrhiza*-Pilz in irgend einer Weise beteiligt sei. Herr Prof. Senn schlug mir vor, diese Frage zu untersuchen. So nahm ich im Sommer 1922 die Arbeit in Angriff, welche die Ernährungsverhältnisse des Wurzelpilzes von *Neottia Nidus avis* klarlegen sollte.

In den 40er Jahren des vorigen Jahrhunderts haben Reisseck (1846) und Schleiden (1849) in den Zellen von Orchideenwurzeln braune Klumpen entdeckt, welche später von Schacht (1854) mit Sicherheit als Knäuel aus Pilzmyzel erkannt worden sind. Das Vorkommen von Pilzfäden im Innern von lebenden Pflanzenzellen hatte zur Aufstellung verschiedener Theorien Anlaß gegeben; so mußten diese Fäden als Stütze der Hypothese von der Urzeugung dienen, oder sie wurden als abnorme, krankhafte Erzeugnisse der *Neottia*-Wurzel, oder als eigentliche Parasiten dieser Orchidee betrachtet (vgl. Schacht, 1854, S. 377). Im Jahre 1873 stellte als-

dann Drude das regelmäßige Vorkommen des Wurzelpilzes in bestimmten Zellreihen von Rhizom und Wurzeln fest, wies in Stengeln, Blättern und Blüten Chlorophyll nach und leistete durch seine Assimilationsversuche den Nachweis, daß die blaßbraune *Neottia* der Kohlensäureassimilation fähig ist. Aber im Hinblick auf die geringe Menge der assimilierten Kohlensäure betonte er, daß der große Stärkegehalt, welchen *Neottia* schon bei ihrem Austritt aus dem Boden aufweist, nicht auf der Kohlensäureassimilation beruhen könne, und daß *Neottia* wohl als Saprophyt organische Stoffe aus dem Boden beziehe. Ob das richtig sei, und welche Bodenbestandteile die Chlorophylltätigkeit der oberirdischen Organe zu ersetzen vermöchten, blieb aber bis heute eine offene Frage. Obwohl schon Drude darauf hingewiesen hatte, daß der in den Wurzeln regelmäßig vorkommende Pilz nicht als Parasit angesehen werden könne, sondern mit der Ernährung der *Neottia* im Zusammenhang stehen müsse, ist es nicht gelungen, diese Vermutung experimentell auf ihre Richtigkeit zu prüfen.

Wohl haben sich in neuerer Zeit viele Forscher mit *Neottia* beschäftigt, und zwar Bernard (1899) mit der Keimung der Samen und Magnus (1900) mit dem Vorgang der Verdauung des Pilzes durch die Wurzelzellen. Peklo (1906) untersuchte hauptsächlich die vegetative Fortpflanzung von *Neottia* und suchte den Wurzelpilz zu isolieren und zu kultivieren, was ihm aber nicht recht gelang. Auch Burgeff (1909) konnte den *Neottia*-Pilz nicht züchten, obwohl er dies bei manchen tropischen und einheimischen Orchideen mit Erfolg getan hatte.

Über die Entwicklungsgeschichte der braunen Chromatophoren und über die Natur des braunen Farbstoffes sind mehrere Untersuchungen angestellt worden (siehe bei Henrici und Senn, 1925). Die Kohlensäureassimilation ist seit den Versuchen von Drude besonders durch Frl. Henrici (Henrici und Senn, 1925) untersucht worden. Ihre Assimilationsversuche haben ergeben, daß der ökonomische Koeffizient, d. h. das Verhältnis zwischen Assimilation: Atmung, nur zur Zeit vor dem Aufblühen wesentlich höher ist als 1. Wir können deshalb mit Sicherheit annehmen, daß die besonders in der jungen *Neottia*-Pflanze in so großer Menge vorhandene Stärke (Fuchs und Ziegenspeck, 1924) nicht aus der Kohlensäureassimilation der *Neottia* stammen kann. Nun haben Fuchs und Ziegenspeck (1924) nachgewiesen, daß *Neottia* während ihres unterirdischen Lebens im Winter eine Zunahme an Kohlen-

stoffverbindungen zu verzeichnen hat. Als Quelle dieser Zunahme kommt nach diesen Forschern die hauptsächlich in dieser Zeit vonstatten gehende Verdauung des Pilzes in Betracht.

Trotz allen diesen Untersuchungen und den darauf begründeten mannigfachen Ernährungstheorien, welche dem Pilz alle diejenigen physiologischen Funktionen zuweisen, deren *Neottia* selbst nicht fähig ist, wissen wir über die Physiologie des Wurzelpilzes so gut wie nichts, da es noch nie gelungen war, ihn richtig zu kultivieren. Als ich aber nach einigen mißlungenen Vorversuchen kräftige Kulturen erhielt, untersuchte ich an diesen die Ernährungsweise des Pilzes. Die ersten Ergebnisse habe ich letztes Jahr kurz mitgeteilt (Wolff, 1925).

Vorliegende Untersuchungen habe ich im Botanischen Institut der Universität Basel in den Jahren 1922—1926 ausgeführt.

Es ist mir eine angenehme Pflicht, meinem verehrten Lehrer Herrn Prof. G. Senn für die Überlassung des Themas und für das Interesse, das er meiner Arbeit entgegengebracht hat, sowie für die mannigfache Förderung meinen aufrichtigsten Dank auszusprechen.

Mehrfach kam ich in die Lage, fremde Hilfe in Anspruch zu nehmen. Herr Prof. H. Kreis bestimmte den Stickstoffgehalt meiner Kulturen. Herr Prof. K. Spiro führte mich in die Methoden der pH-Bestimmung ein und stellte mir bereitwilligst einen Arbeitsplatz in der physiolog.-chem. Anstalt zur Verfügung. Mein Freund cand. phil. M. Geiger machte mich mit den Methoden der Titerbestimmungen bekannt und überließ mir eine Reihe mit äußerster Sorgfalt hergestellter Photographien meiner Kulturen. Während meiner Abwesenheit überwachte diese Herr Ritter, Abwart am Botan. Institut. Frl. Dr. Ch. Ternetz (Basel) und Dr. M. Henrici (Südafrika), sowie die Herren Prof. F. E. Weiß (Manchester), Prof. W. Rytz (Bern), Dr. G. Keller (Aarau), Dr. H. Wirz (Basel), Univ.-Gärtner H. Schenk (Bern) und die Chem. Fabrik A.-G. vorm. B. Siegfried (Zofingen) haben durch Überlassen von Literatur, Photographien und Mitteilungen meine Arbeit kräftig unterstützt. Ihnen allen sage ich hiermit meinen besten Dank.

Abschnitt I.

Die Morphologie des *Orcheomyces Neottiae.*

Obwohl ich meine Untersuchungen mit der Herstellung von Reinkulturen begann und die Morphologie des Pilzes erst nachher

auf Grund des in diesen Kulturen gewonnenen Materials untersuchte, beginne ich mit der Besprechung der Morphologie des Pilzes, um die Darstellung seines physiologischen Verhaltens später nicht durch morphologische Angaben unterbrechen zu müssen.

Die vom geimpften Myzelflöckchen in die Nährflüssigkeit strahlenförmig auswachsenden Hyphen sind farblos und gleichmäßig septiert. Ihre Dicke mißt durchschnittlich 3—5 μ und ihre Länge 20—30 μ. In ziemlich regelmäßigen Abständen treten Verzweigungen auf, deren Glieder nur etwa 3 μ breit und 10—20 μ lang sind. An Stelle der Verzweigungen werden aber meistens Konidienketten gebildet, deren Sporen eine Breite von 6—10 μ und eine zwischen 5—20 μ schwankende Länge aufweisen. Die Konidien- oder Sporenketten können eine Länge von 40—80 μ erreichen. Sie

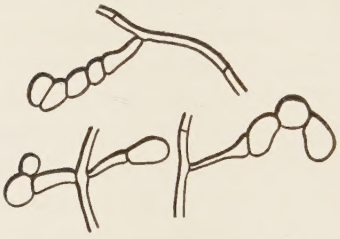

Fig. 1. *Orcheomyces Neottiae.* Tanninkultur, Konidienketten an der Oberfläche der Nährlösung gebildet. Vergr. 240.

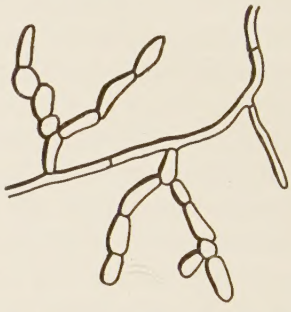

Fig. 2. *Orcheomyces Neottiae.* Tanninkultur, Konidienketten in der Nährflüssigkeit gebildet. Vergr. 240.

werden gewöhnlich in den untergetauchten Myzelflocken der Flüssigkeitskulturen gebildet; wachsen diese aus der Nährflüssigkeit heraus, so bilden sie die Konidien auch an der Luft. Aber nie kommt es zur Bildung einer filzigen, auf der Oberfläche der Flüssigkeit ausgebreiteten Myzeldecke, wie bei den Schimmelpilzen. Dank diesem Umstand läßt sich leicht feststellen, ob eine Kultur rein oder durch Schimmelpilze verunreinigt ist. In älteren Kulturen sind Hyphen und Sporen je nach der angewandten Kulturflüssigkeit farblos, gelb oder braun gefärbt. Ein Auseinanderfallen der Konidienketten habe ich nie beobachtet, wohl aber, daß endständige Konidien Hyphen austrieben und wieder neue Konidien bildeten (Fig. 3). In einzelnen Kulturen traten lockere Hyphenknäuel auf; bisweilen konnte ich Anastomosen zwischen Hyphen verschiedener Her-

kunft konstatieren (vgl. Fig. 4, bei *). Auch die Abbildungen von Bernard (1909) zeigen anastomosierende Hyphen, und Burgeff (1909) fand solche in den meisten seiner Kulturen.

In Agarplattenkulturen, welche ich durch Abimpfen von Flüssigkeitskulturen erhalten hatte (1 % Agar, 2 % Tannin oder Glukose, 0,1 % KH_2PO_4, 0,02 % $MgSO_4$), wuchs der Pilz im Substrat, bildete jedoch auch Lufthyphen und einen lockeren braunen Überzug von Sporenhäufchen. Die Differenzierung des Myzels war dieselbe wie in den Flüssigkeitskulturen; nur trat die Entwicklung des Myzels hinter derjenigen der Sporen stark zurück.

Offenbar läßt sich der aus der *Neottia*-Pflanze isolierte Pilz zunächst leichter an die den natürlichen Verhältnissen ähnlicheren

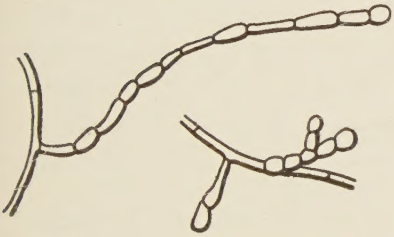

Fig. 3. *Orcheomyces Neottiae.* Glukosekultur, mit ausgekeimter Endspore. Vergr. 240.

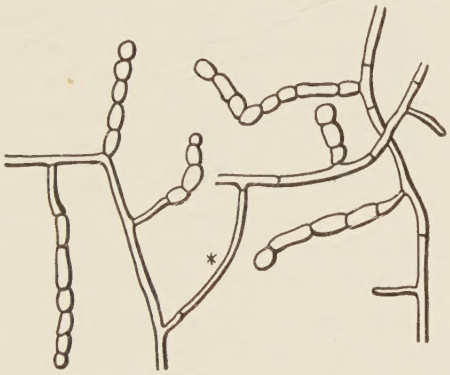

Fig. 4. *Orcheomyces Neottiae.* Glukosekultur, Myzel und Konidienketten. Anastomose bei *. Vergr. 240.

Bedingungen der Flüssigkeitskulturen gewöhnen, als direkt an die festen Nährböden. Darauf beruht vielleicht der Mißerfolg der bisherigen Forscher, welche diesen Pilz auf festen Substraten zu kultivieren versuchten.

Je nach der Zusammensetzung der Nährlösung zeigte der Pilz besondere morphologische Eigentümlichkeiten.

a) In Tanninkulturen blieben die Hyphen meist farblos und die Konidienketten gelbbraun. In der Nährflüssigkeit waren meist einfache (Fig. 1), auf derselben hingegen nur verzweigte (Fig. 2) Sporenketten gebildet worden.

b) In Glukosekulturen waren die Hyphen braun und die Sporen grau. Die selten verzweigten Konidienketten zeigten oft

neu ausgekeimte Endsporen (Fig. 3) und Anastomosen sich berührender Kurzhyphen (Fig. 4, bei *).

c) In Lävulosekulturen trat Bildung von lockeren Hyphenknäueln auf. Die Hyphen und Sporen waren farblos, die Konidienketten kurz und verzweigt (Fig. 5).

Wie auf Seite 7 mitgeteilt werden wird, stimmen meine Befunde mit Burgeffs Beschreibungen (1909, S. 16—27) und Abbildungen (Taf. I—III) in weitgehendem Maße überein. Die Differenzierung des Myzels in Lang- und Kurzhyphen, sowie die Entstehung von Konidienketten an den Kurzhyphen ist, wie meine Abbildungen zeigen, sozusagen dieselbe, wie sie Burgeff für seine II. Gruppe, Typus: *Orcheomyces apiferae* (Burgeff) auf S. 25 beschreibt. Darum habe ich den aus *Neottia* isolierten Pilz als *Orcheomyces Neottiae* bezeichnet, was mir als gegeben erscheint, da andere Fortpflanzungsorgane als Konidien nie zur Beobachtung kamen. Der Pilz gehört zu Burgeffs Gruppe: *Orcheomyces apiferae* (Burgeff) = *Rhizoctonia repens* (Bernard, 1909, S. 26 und Fig. 3).

Fig. 5. *Orcheomyces Neottiae.* Lävulosekultur, Konidienketten und lockere Hyphenknäuel. Vergr. 240.

Abschnitt II.

Die Kultur des *Orcheomyces Neottiae.*

1. Feste Nährböden.

Zunächst handelte es sich darum, eine Kulturmethode zu finden, welche es möglich machte, den Pilz aus der *Neottia*-Wurzel herauszuzüchten und in freier Kultur in beliebiger Menge zu erhalten. Peklo (1906, S. 272) legte ganze Wurzelscheiben auf Gelatineplatten und beobachtete ein Aussprossen von Hyphen. Burgeff (1909, S. 12) impfte Wurzelausstiche, welche er steril der Wurzel entnahm, auf Agar- und Gelatineplatten; aber trotz großer Variation der Nährböden mißlang die Kultur. Fuchs und Ziegenspeck (1924, S. 130) berichten zwar, daß ihnen die Isolierung des *Neottia*-Pilzes auf Gummi arabicum- und Salep-Agar gelungen sei, daß der Pilz unter der Agarschicht wachse, also schwach anaërob sei; doch

machen sie über die Kultur des Pilzes und seinen Stoffwechsel keine näheren Angaben.

Ich benützte anfänglich Agarplatten, welche Pepton, Glukose und Stärke, Auszüge von Humus, *Neottia*-Wurzeln, Tannennadelstreu und Buchenblättern enthielten, und impfte dann mit ganzen Wurzelscheiben, welche ich so gut wie möglich mit Alkohol sterilisiert hatte. Es zeigte sich aber bald, daß diese Methode unzulänglich war, da eine reiche Flora von Schimmelpilzen und Bakterien die Beobachtung der Wurzelscheiben und ihres Pilzes unmöglich machte. Ich präparierte deshalb mit sterilen Nadeln die Pilzballen unter dem Mikroskop aus den Wurzelscheiben heraus und impfte diese steril auf die Nährböden. Aber auch diese Kulturen führten nicht zum Ziel, obwohl saure, neutrale und alkalische Nährböden zur Verwendung kamen. Zwar konnte ich unter dem Mikroskop das Aussprossen der Pilzballen verfolgen, aber zu makroskopischem Wachstum kam es nie. Neue Agar-Nährböden, welche äpfel-, butter-, milch-, essig- und zitronensaure Salze enthielten, ergaben ebenfalls kein Wachstum, und nur eine Kultur, die ich in Leitungswasser ohne Agar anlegte, zeigte eine etwas bessere Myzelentwicklung.

2. Flüssigkeitskulturen.

Ich brachte deshalb vor meiner Abreise in die Ferien (1922) sauber gewaschene Wurzelstücke in sechs Schalen mit Leitungswasser. Bei meiner Rückkehr nach vier Wochen waren sämtliche Schnittflächen der Wurzelstücke von dichten Myzelflocken umgeben. Die Untersuchung ergab in allen sechs Schalen dieselben Hyphenformen, nämlich Langhyphen, Kurzhyphen sowie reichliche Konidienbildung. Die Vergleichung meiner Präparate mit Burgeffs Abbildungen und Beschreibungen von Orchideen-Wurzelpilzen ergab fast völlige Übereinstimmung.

Weitere Versuche mit Wasserkulturen und Knopscher Nährlösung lieferten dasselbe Resultat. Ich verzichtete absichtlich darauf, die Wurzeln in organischer Nährlösung zu halten, um nicht eine allzu starke Entwicklung von Mikroorganismen hervorzurufen. Da organische Substanzen an der Oberfläche der Wurzel jedenfalls nicht vollständig fehlten, hätte die anorganische Nährlösung etwa vorhandenen Sporen anderer Pilze das Auskeimen erlaubt.

Nun mußte zunächst die Frage, ob der Pilz auch wirklich aus dem Innern der Wurzelstücke stamme, durch eine gründliche Sterili-

sation der Wurzeln entschieden werden. Zu diesem Zwecke legte ich Wurzelstücke während zweier Tage in die Knopsche Nährlösung, damit alle ihnen oberflächlich anhaftenden Pilzsporen und Hyphen austreiben konnten, sterilisierte sie dann ca. 5 Sekunden serienweise in 30-, 60- und 90-proz. Alkohol, brachte die Wurzelstücke in frische sterile Nährlösung der gleichen Zusammensetzung und wiederholte diese Alkoholsterilisation an drei aufeinanderfolgenden Tagen. Erst dann kamen die Wurzelstücke in die auf S. 12 angegebenen Nährlösungen. Diese Sterilisation mit Alkohol hatte zur Folge, daß nach 1—2 Wochen nur noch $^2/_3$ aller Wurzelstücke Pilze austrieben, $^1/_3$ war durch den Alkohol vollständig abgetötet. Dabei spielten übrigens die verschiedenen zur Anwendung gelangten Konzentrationen des Alkohols keine Rolle; die vollständig steril gebliebenen Wurzelstücke verteilten sich wenigstens gleichmäßig auf die drei angewendeten Konzentrationen. So hatte ich die Garantie, daß der austreibende Pilz nicht von Verunreinigungen des Wurzelstückes herrührte, sondern wirklich aus dem Innern hervorgewachsen war. Auch waren wieder in allen Kulturen die oben angeführten Wuchsformen aufgetreten; es handelte sich somit um denselben Pilz. Verunreinigungen durch andere Pilze zeigten sehr bald ein anderes makroskopisches Bild, indem sich diese unmittelbar unter und auf der Oberfläche der Kulturflüssigkeit entwickelten, und zwar meist schon nach wenigen Tagen, während der Wurzelpilz völlig untergetaucht wuchs und erst nach 8 bis 14 Tagen auszutreiben begann.

Ca. 50 weitere Versuche mit *Neottia*-Wurzeln von den verschiedensten bis zu 40 km auseinander liegenden Standorten aus der näheren und weiteren Umgebung Basels (Witterswilerberg, Kienberg-Sissacherfluh, Helfenberg-Paßwang), wie auch alle später in den Jahren 1923—25 angesetzten Kulturen ergaben ausnahmslos die oben angeführten Resultate. Die auf diese Weise erhaltenen Kulturen ermöglichten durch Abimpfen kleiner Myzelflocken weitere Reinkulturen zu erhalten, die von einer einzigen Ausgangskultur stammten.

Zunächst galt es aber einen günstigen Nährboden zu finden, in welchem in möglichst kurzer Zeit viel Myzel zur Entwicklung gelangen konnte. Die auf S. 7 erwähnten Salze organischer Säuren kamen wieder zur Verwendung. Als Stickstoffquellen wurden Albumin, Pepton, Leuzin, Glykokoll, Hämoglobin und Harnstoff in 0,1 proz. Lösung benützt. Die Salze

organischer Säuren wurden in 0,5 proz. Lösungen angewendet, denen jeweilen 0,1 % KH_2PO_4 und 0,02 % $MgSO_4$ zugesetzt wurden. In jeder Versuchsreihe mit stickstoffhaltiger Nährlösung befand sich auch eine Kultur, die als Kohlenstoffquelle 0,5 % Tannin enthielt. Von diesen Nährlösungen brachte ich 10 cm^3 in die Erlenmeyerkölbchen, die sorgfältig sterilisiert und dann mit dem Wurzelpilz geimpft wurden. Gewöhnlich ließ ich ihn 30 Tage im Dunkeln bei ca. 17° wachsen.

Die in Tabelle 1 enthaltenen Resultate zeigen, daß der Pilz von Stickstoffverbindungen Glykokoll und Hämoglobin bevorzugt, von Kohlenstoffquellen hauptsächlich buttersaures Kalium, äpfelsaures Kalzium und essigsaures Ammonium. Eine Überraschung brachte die Entwicklung des Pilzes in Tannin. Die Myzelflocken erfüllten die ganze Nährflüssigkeit; somit kam zunächst Tannin als die beste Kohlenstoffquelle für die weiteren Versuche in Betracht.

Tabelle 1.

Neottia-Pilz, Flüssigkeitskulturen Nr. 1—41.

0 = keine Myzelentwicklung,
\+ = Myzel füllt $^1/_4$ der Flüssigkeit,
++ = Myzel füllt ganze Kulturflüssigkeit.

0,1 % N-Verbindungen	0,5 % Buttersaures K	0,5 % Milchsaures Na	0,5 % Zitronensaures K	0,5 % Äpfelsaures Ca	0,5 % Äpfelsaures NH_4	0,5 % Essigsaures NH_4	0,5 % Tannin
1. Albumin	+	0	0	0	0	0	++
2. Pepton	+	0	0	+	0	0	++
3. Leuzin	+	0	0	+	0	+	++
4. Glykokoll	+	+	+	+	0	+	++
5. Hämoglobin	+	+	0	+	+	+	++
6. Harnstoff	0	0	0	0	0	+	++

Tabelle 2.

Neottia-Pilz, Erklärungen wie Tabelle 1. Erklärung der Buchstaben im Text.

Versuchsreihen	sauer	neutral	alkalisch
A. aërob mit N	+	0	0
B. aërob ohne N	+	0	0
C. aërob mit N, im Luftstrom . . .	++	+	+
D. aërob ohne N, im Luftstrom . .	++	+	0
E. anaërob mit N	0	0	0
F. anaërob ohne N	0	0	0

Die nun folgenden Versuchsreihen hatten den Zweck, das Sauerstoffbedürfnis des Pilzes festzustellen.

Die in Tabelle 2 erwähnten Nährlösungen enthielten:
0,1 % Tannin als Kohlenstoffquelle,
die Reihen ACE 0,1 % Glykokoll als Stickstoffquelle,
die Reihen BDF enthielten keine Stickstoffverbindung.
Als anorganische Salze waren 0,1 % KH_2PO_4 und 0,02 % $MgSO_4$ zugegeben worden.

AB wurden mit Watte verschlossen und ohne besondere Luftzufuhr stehen gelassen. CD wurden durchlüftet und EF als anaërobe Kulturen über alkalischer Pyrogallollösung gehalten. Jede Reihe bestand aus 9 Kölbchen; je 3 hatte ich mit 20 cm^3 saurer, neutraler und basischer Nährlösung beschickt.

Nach 8 Tagen ergaben die Kulturen die in Tabelle 2 enthaltenen Resultate.

Die anaëroben Kulturen haben selbst bei Zugabe von Stickstoffverbindungen ganz versagt. Die aëroben Reihen AB ohne besondere Durchlüftung zeigten nur in saurer Lösung mittlere Myzelentwicklung. Die Reihen CD mit durchgehendem Luftstrom ergaben in saurer Nährflüssigkeit sehr gute, in neutraler mittelgute Entwicklung; nur in einem Falle bei C, mit Glykokoll als Stickstoffquelle, ergab eine basische Kultur Wachstum, das jedoch nur in der Bildung kleiner Myzelflocken bestand.

Tabelle 2 zeigt also klar, daß der Wurzelpilz von *Neottia* die saure Nährlösung bevorzugt und den Sauerstoff unbedingt benötigt.

Eine Überraschung brachten die Versuchsreihen C und D (vgl. Tab. 2). In beiden war der Pilz sehr gut gewachsen, obwohl D im Gegensatz zu C keine Stickstoffverbindungen enthielt. Diese außerordentliche Förderung des Wachstums mußte mit dem Durchleiten von Luft im Zusammenhang stehen; denn die Vergleichskulturen B, welche die gleichen Nährsalze enthielten, aber nicht durchlüftet wurden, waren gegenüber den durchlüfteten in ihrer Myzelentwicklung zurückgeblieben. Aus der Tatsache, daß sich der Pilz in Stickstoff-freier Lösung ebenso gut entwickelte wie in stickstoffhaltiger, schien sich zu ergeben, daß er den elementaren Stickstoff der Luft zu assimilieren vermöge, welcher durch den Luftstrom ständig zugeführt wurde.

Obwohl Burgeff (1909, S. 46) für die von ihm isolierten Orchideenwurzelpilze und Huber (1921, S. 325) für den Pilz von

Liparis Loeselii keine Assimilation des Luftstickstoffes nachweisen konnten und deshalb diesen Pilzen die Fähigkeit zur Luftstickstoffbindung absprachen, suchte ich durch besondere Kulturbedingungen diese Frage zunächst für *Neottia* zu entscheiden. Ich benützte die von Frl. Ternetz (1907, S. 369—371) ausgearbeitete Methode mit flüssigen Nährmedien. Zunächst sind solche für die spätere Analyse viel praktischer als feste Nährböden, da sie sowohl den Verbrauch an Kohlenstoffverbindungen als auch das Frisch- und Trockengewicht des Pilzes leicht zu bestimmen erlauben. Sodann haben die stickstofffreien Kulturen auch den schon von Ternetz (S. 368) erwähnten Vorteil, daß sie größere Sicherheit gegen Verunreinigungen bieten. Daß auf die Anlegung der Kulturen die peinlichste Sorgfalt verwendet wurde, ist selbstverständlich.

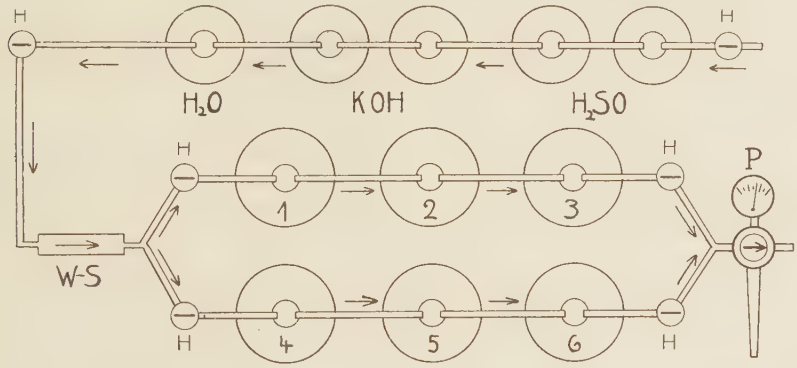

Fig. 6. Kulturanordnung. *W-S* = Wattesicherung, *H* = Hahn, *P* = Luftpumpe, *1—6* = Kulturgefäße, H_2SO_4, *KOH*, H_2O = Waschflaschen.

Fig. 6 zeigt die Anordnung, die sich bei der Kultur meiner Wurzelpilze bewährte und bei den Versuchen über die Assimilation des atmosphärischen Stickstoffs in Anwendung kam.

Die mittels der Luftpumpe durchgesogene Luft passierte zwei Waschflaschen mit Schwefelsäure, welche das Ammoniak der Laboratoriumsluft absorbierte. Daß dies auch wirklich der Fall war, wurde durch Analysen festgestellt. Zwei Waschflaschen mit Kalilauge absorbierten die Kohlensäure, und eine Waschflasche mit destilliertem Wasser gab dem in der Schwefelsäure getrockneten Luftstrom die nötige Feuchtigkeit. Bevor nun die Luft in die Kulturgefäße gelangte, wurde sie in einem 20 cm langen Glasrohr mit sterilisierter Watte gereinigt. Ein Gabelstück teilte den Luftstrom, und dieser wurde durch ein langes Glasrohr in die Nährflüssigkeit eingeleitet und durch ein kurzes Rohr wieder abgesogen. Die beiden Glasröhren, welche die Durchlüftung der Kulturgefäße besorgten, enthielten Einlagen von steriler Watte, welche das Eindringen von Bakterien und Pilzsporen während des Aufstellens der Kulturgefäße verhinderte. Alle Teile, die bei den Kulturen in Anwendung kamen, wurden vor Gebrauch tüchtig gereinigt: sämtliche

Glasgefäße und Röhren in heißer Chrom-Schwefelsäure und kochendem Wasser, dann mit 90 proz. Alkohol staubfrei getrocknet. Die Gummischläuche wurden in 90 proz. Alkohol gereinigt. Die doppelt durchbohrten Korke, welche als Verschluß der Kulturgefäße zur Anwendung kamen, wurden unter der Luftpumpe mit Alkohol injiziert, dann in Wasser ausgekocht und mit den durchgesteckten Glasröhren samt Watteeinlagen und den Kulturgefäßen im Dampftopf sterilisiert.

Die Chemikalien waren von Merck in Darmstadt und von der Chemischen Fabrik vorm. B. Siegfried in Zofingen bezogen worden. Sie wurden auf ihren Stickstoffgehalt geprüft und als N-frei befunden.

Die verwendeten Nährlösungen hatten folgende Zusammensetzungen:

100 cm^3 NH_3-freies destilliertes Wasser,
KH_2PO_4 0,1 % und $MgSO_4$ 0,02 %.

Kohlenstoffquellen:

Tannin	$^1/_2$, 1, 2, 4, 6, 8, 10 %	Arabinose	1 %
Gallussäure	2 %	Xylose	1 %
Glukose	2 und 3 %	Inulin	1 %
Lävulose	2 %	Zellulose	0,5 %
Gummi arabicum	1 % (nicht N-frei)	Salep	1 und 2 % (nicht N-frei).

Stickstoffquellen:

$(NH_4)_2SO_4$	0,02 %	KNO_3	0,005—0,010 %.

Stickstoffverbindungen habe ich zugesetzt, um ihren eventuellen Einfluß auf die Intensität der Assimilation des elementaren Stickstoffs der Luft festzustellen.

Die Nährstoffe wurden für jede einzelne Kultur besonders abgewogen, das destillierte Wasser jedesmal ausgekocht und noch siedend zugegeben. Dann wurde im Dampftopf während drei aufeinanderfolgender Tage je zwei Stunden sterilisiert und die Nährlösungen jedesmal bis zum Erkalten im Dampftopf belassen.

Waren auch bis dahin alle Vorsichtsmaßregeln getroffen, welche ein Gelingen der Kulturen verbürgten, so brachte das Impfen noch manche Schwierigkeiten mit sich; machte doch die geringste Unvorsichtigkeit die Arbeit zweier Wochen unbrauchbar. Ich bereitete deshalb die ganze Manipulation am Abend vor, so daß ich am folgenden Morgen in noch unbetretenem und verschlossenem Zimmer die Kulturflüssigkeiten mit Sicherheit rein impfen konnte.

Nach dem Impfen wurden sämtliche Verschlüsse mit einem Gemisch von Wachs und Kolophonium übergossen. Daß die Kulturen, welche das Impfmaterial abgaben, auf ihre Reinheit geprüft

wurden, ist selbstverständlich, ebenso, daß nach Abschluß der Kulturen die Prüfung auf deren Reinheit wiederholt wurde.

Verunreinigungen durch Bakterien traten nur in wenigen Kulturen auf, häufiger waren solche von *Penicillium glaucum*, *Aspergillus niger*, seltener von *Citromyces*. Verunreinigte Kulturen fanden keinerlei Berücksichtigung.

3. Wasserstoffionenkonzentration.

Wie ich schon bei der Besprechung der Vorversuche mitgeteilt habe, bevorzugt *Orcheomyces Neottiae* saure Lösungen. Die Prüfung der verschiedenen Nährflüssigkeiten hat pH-Werte von 3,5—5,2 ergeben (vgl. Tab. 4 u. 5). Diese H-Ionenkonzentrationen sind nicht absichtlich hergestellt worden, sondern sie waren bedingt durch die jeweilen in der Lösung enthaltenen Nährstoffe und Salze.

Die H-Ionenkonzentrationen der farblosen Lösungen wurden kolorimetrisch nach dem Walpoleschen Prinzip, die der gefärbten Lösungen elektrometrisch, nach der Chinhydronmethode bestimmt.

Die vor und nach der Kultur ausgeführten Messungen ergaben in den Nährlösungen mit Inulin, Salep, Xylose und Gummi arabicum keine Änderung der H-Ionenkonzentration. Eine Abnahme erfuhr diese in den Lävulosekulturen von pH 4,8 auf 5,2 und in den Zellulosekulturen von pH 4,7 auf 4,8; eine Zunahme hingegen in den Kulturen mit Arabinose von pH 4,4 auf 4,3, Glukose von pH 4,4 auf 4,1 und Tannin von pH 3,5 auf 3,3.

Obwohl der Pilz durch seinen Stoffwechsel die H-Ionenkonzentration der Nährlösungen nur wenig veränderte und bei den meisten Kulturen sich deshalb keine Änderungen in der Pilzentwicklung zeigten, weist das physiologische Verhalten des Pilzes in Tanninkulturen darauf hin, daß die Steigerung der H-Ionenkonzentration von pH 3,5 auf 3,3 genügt, um dessen Wachstum und Stoffwechsel stillzulegen. Somit scheint mit pH 3,3 das für *Orcheomyces Neottiae* zulässige Maximum der H-Ionenkonzentration erreicht zu sein (nähere Erklärung hierfür siehe S. 16).

Abschnitt III.

Die Ernährung des *Orcheomyces Neottiae*.

1. Kohlenstoffquellen.

Auf ihren Nährwert als Kohlenstoffquellen und ihren Einfluß auf die Stickstoffassimilation des Pilzes wurden folgende Verbindungen geprüft:

Tannin, Glukose, Lävulose, Salep, Inulin, Arabinose, Xylose, Gummi arabicum, Gallussäure und Zellulose.

Zur Feststellung, in welcher Weise der Pilz die gebotenen Kohlenstoffquellen verarbeitet hatte, wurden folgende Methoden angewandt:

Der Tanningehalt der Nährlösungen wurde vor und nach der Kultur mit der von Malvezin in Koch (1922, S. 84) beschriebenen Methode bestimmt. Nach dieser wird die Gerbsäure mit ammoniakalischer Zinkazetatlösung gefällt und die schwefelsaure Lösung des Niederschlages mit Kaliumpermanganat titriert. Das bei der Fällung erhaltene Filtrat wurde dann auf Glukose und Gallussäure geprüft. Letztere wies ich nur qualitativ nach Rosenthaler (1914, S. 374) mit Kaliumzyanid (Rotfärbung durch Schütteln) und Eisenchlorid (Tinte) nach.

Die Glukose- und Lävuloseanalysen wurden nach der in Koch (1922, S. 104 ff.) angegebenen Methode ausgeführt, nach welcher siedende Fehlingsche Lösung von bekanntem Cu-Gehalt mit der zu untersuchenden Zuckerlösung titriert wird.

Das in den Pilzhyphen gebildete Glykogen wurde qualitativ mit Jodjodkalium nachgewiesen.

a) Einfluß der Kulturdauer und der Nährstoffmenge.

Aus dem Verhältnis von Kohlenstoffverbrauch und Myzelentwicklung ergibt sich, daß der Verbrauch an Tannin, Glukose und Lävulose von der Kulturdauer, sowie von der Menge des gebildeten Myzels abhängt, welche durch das Trockengewicht des Pilzes illustriert wird. Mit zunehmender Kulturdauer wird das Pilztrockengewicht, sowie der Verbrauch an Kohlenstoffverbindungen größer (vgl. Tab. 3 Kult.-Nr. 115 mit Nr. 55). Dieser Schluß gilt aber restlos nur für Glukose- und Lävulosekulturen; in Tanninkulturen nimmt das Trockengewicht nach einer Kulturperiode von ca. 100 Tagen wieder ab (vgl. Tab. 3, Kult.-Nr. 108—110 mit Nr. 49, 51, 53). Die Erklärung dieser Tatsache läßt sich aus dem Zustand des Pilzes und aus den Analysen der Kulturflüssigkeiten ableiten. Die Hyphen aller Glukose- und Lävulosekulturen, sowie der Tanninkulturen 108 bis 110 enthielten nämlich Glykogen, in den Tanninkulturen 49, 51, 53 hingegen kein Glykogen, sondern Tropfen eines fetten Öls. Die Analysen der Flüssigkeiten haben in Nr. 108—110 Glukose ergeben, in Nr. 49, 51, 53 dagegen weder Glukose noch Gallussäure.

Tabelle 3.

Neottia-Pilz, Myzelentwicklung und Verbrauch an C-Quellen.

Kultur-Nr.	Kulturdauer in Tagen	Kolbeninhalt in cm^3	C-Quelle	Trockengewicht des Myzels in mg	C-Quelle geboten in mg	C-Quelle verbraucht in mg	C-Quelle verbraucht in %
49	120	100	Tannin	54	± 2000	513	26,4
51	120	100	„	51	± 2000	678	34,8
53	120	100	„	56	± 2000	572	29,3
108	76	100	„	72	1999	128	6,6
109	76	100	„	77	2012	214	10,9
110	76	100	„	98	2037	295	14,9
120	74	300	„	203	5990	1103	18,5
122	74	300	„	194	6017	1142	18,7
111	78	100	Glukose	30	2003	301	15,0
112	78	100	„	30	2035	287	14,1
113	78	100	„	310 [1]	2028	1667 [1]	82,2
55	120	100	Lävulose	42	± 2000	846	42,3
115	78	100	„	20	2037	334	16,4
116	78	100	„	150 [1]	2020	1024 [1]	50,7
123	74	300	„	116	6018	3430	56,8
124	74	300	„	94	6012	3378	56,1
125	74	300	„	86	6015	3343	55,5

Daraus läßt sich schließen, daß sich der Pilz in Lävulose und Glukose solange entwickeln kann, als eben diese Stoffe vorhanden sind. In Tannin hingegen erreicht der Kohlenstoffverbrauch, die Pilzentwicklung und die Nährstoffspeicherung relativ bald ein Maximum, auf welches ein Stillstand der Entwicklung folgt, obwohl in der Nährlösung noch $^3/_4$ der ursprünglich gebotenen Menge des nicht in Glukose und Gallussäure gespaltenen Tannins nachgewiesen werden kann. In den nur 76 Tage dauernden Tanninkulturen 108 bis 110 war bei Abbruch des Versuches noch genügend gespaltene Glukose vorhanden, der Pilz hätte sich also weiter entwickeln können und enthielt auch noch Glykogen; in den lange, d. h. 120 Tage dauernden Tanninkulturen 49, 51, 53 dagegen war nicht nur die vom Pilz aus dem Tannin abgespaltene Glukose, sondern auch die dabei freigewordene Gallussäure vollständig verbraucht; auch enthielt das Myzel kein Glykogen mehr. Solches war offenbar auch in diesen Kulturen anfangs etwa bis zum 80. Tage gespeichert, dann aber,

1) KNO_3-Beigabe.

als die Glukose zu mangeln begann, für die Atmung nachträglich verbraucht worden. Ich schließe dies aus der Tatsache, daß das ölhaltige Myzel 120 Tage alter Kulturen ein geringeres Trockengewicht aufwies, als dasjenige von nur 76 Tage alten Kulturen, das noch Glykogen enthielt. In den alten Kulturen scheint der Pilz in eine Art Dauerzustand mit latentem Leben überzugehen.

Die Ursache dieser Erscheinung habe ich nicht genauer untersucht. Jedenfalls kann sie nicht von einem Mangel an anorganischen Salzen herrühren, da in den Glukose- und Lävulosekulturen, welche dieselbe Salzkonzentration enthielten, die Pilzentwicklung nicht zum Stillstand kam. Ich vermute deshalb, daß die hohe Konzentration der H-Ionen am Stillstand der Entwicklung schuld ist, obwohl die in der ursprünglichen Lösung vorhandene Konzentration von pH 3,5 während der Kulturdauer nur auf pH 3,3 gestiegen war. Vergleicht man aber die H-Ionenkonzentration der Gerbstofflösung mit derjenigen anderer Kulturflüssigkeiten vor und nach der Kultur (vgl. Tab. 4 z. B. in Glukose eine Zunahme von pH 4,4 auf 4,1), so zeigt es sich, daß die Tanninlösung mit pH 3,5 vom Pilz offenbar schon als recht sauer empfunden wird. Erleidet diese Konzentration während der Kultur infolge der Zunahme der Gallussäure eine weitere Erhöhung auf pH 3,3, so scheint damit der für *Orcheomyces Neottiae* maximale pH-Wert erreicht zu sein. Dafür spricht auch die Tatsache, daß nach Willstätter und Csanyi (1921) die fermentative Wirkung der Glukosidasen schon bei der H-Ionenkonzentration pH 3 den Nullwert erreicht; sinkt die H-Ionenkonzentration auf pH 4, so steigt der fermentative Wirkungsgrad auf 40% des maximalen Spaltvermögens. Somit liegt, wenn sich die Tannase wie die von Willstätter untersuchten Glukosidasen verhält, die H-Ionenkonzentration des Tannins mit pH 3,5 recht nahe an der Grenze, und die Steigerung auf pH 3,3 genügt offenbar, um die Wirksamkeit oder die weitere Bildung des Fermentes aufzuheben. Ich hatte zwar versucht, die Ansäuerung durch Zusatz von Kreidepulver zu verhindern. Da sich dann aber schon beim Sterilisieren in der Tanninlösung Niederschläge bildeten, mußte ich auf dieses Mittel verzichten. Es wäre übrigens auch möglich, daß Oxydationsprodukte der bei der Spaltung des Tannins entstandenen Gallussäure eine eigentliche Giftwirkung auf den Pilz ausgeübt und dadurch seine weitere Entwicklung gehemmt haben. Ich hoffe, die Frage nach der Ursache der frühzeitigen Hemmung des Pilzwachstums auf Grund späterer Untersuchungen beantworten zu können.

Tabelle 4.

Neottia-Pilz, Assimilation des atmosphärischen N und Verbrauch an C-Verbindungen.

Bezogen auf 100 mg Pilztrockengewicht und 100 Kulturtage.

1 Kultur-Nr.	2 Nährlösung cm^3	C-Verbindung 3 geboten mg	C-Verbindung 4 verbraucht mg	N-Gehalt der Kultur 5 Anfangs mg	N-Gehalt der Kultur 6 Ende mg	Bindung des Luft-N 7 mg	Bindung des Luft-N 8 pro 1 g verbrauchter Glukose	pH 9 Anfangs	pH 10 Ende
		Tannin							
a	100	± 2000	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3,5	3,5
49	100	± 2000	951,8	0,0	0,35	0,35	?	3,5	3,4
51	100	± 2000	1329,6	0,0	0,37	0,37	?	3,5	3,4
53	100	± 2000	1017,8	0,0	0,34	0,34	?	3,5	3,3
90	100	1994	568,8	0,0	0,50	0,50	6,96	3,5	3,4
108	100	1999	228,1	0,0	0,38	0,38	10,80	3,5	3,3
109	100	2012	356,3	0,0	0,41	0,41	9,36	3,5	3,4
110	100	2037	375,0	1,25 $(NH_4)_2SO_4$	1,65	0,40	8,72	3,5	3,3
93	400	8041	1808,0	0,0	1,00	1,00	4,48	3,5	3,3
		Glukose							
b	100	± 2000	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	4,4	4,4
111	100	2003	1282,0	0,0	0,51	0,51	0,42	4,4	4,1
112	100	2035	1208,1	0,0	0,62	0,62	0,50	4,4	4,2
113	100	2028	1428,3	0,83 KNO_3	1,48	0,65	0,46	4,4	4,2
		Lävulose							
c	100	± 2000	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	4,8	4,8
115	100	2037	1887,1	0,0	0,87	0,87	0,47	4,8	5,2
116	100	2020	1279,8	0,83 KNO_3	1,35	0,52	0,41	4,8	5,1

In Glukose- und Lävulosekulturen trat die Bildung von fettem Öl erst nach ca. 200 Tagen auf.

Das Vorhandensein eines fetten Öls hat auch Burgeff (1909, S. 13) bei älteren Kulturen seiner Orchideenwurzelpilze beobachtet; es tritt übrigens auch bei saprophytischen Pilzen nach einiger Zeit auf (vgl. Zellner, 1907, S. 12ff.).

Zur Bildung von Glykogen ist *Orcheomyces Neottiae* nicht nur in Kultur, sondern, wie Fuchs und Ziegenspeck (1924, S. 194) nachgewiesen haben, auch unter natürlichen Bedingungen in der *Neottia*-Wurzel befähigt.

Die Zugabe einer dreifachen Menge von Nährlösung hatte bei gleicher Kulturdauer eine wesentliche Erhöhung des Trockengewichts des Pilzes sowie des Verbrauchs an Tannin (Kult. Nr. 120, 122) und Lävulose (Kult. Nr. 123—125) zur Folge. Bei größerer Nährstoffmenge können vom Pilz eben mehr Stoffe aufgenommen und gespeichert werden.

b) Einfluß der einzelnen Kohlenstoffverbindungen.

1) Tannin.

Van Tieghem (1867, S. 210ff.) hat festgestellt, daß Tannin von einer Reihe von Pilzen als gute Kohlenstoffquelle benützt werden kann. Von diesen Pilzen ist besonders *Aspergillus niger* zu erwähnen, welcher Tannin in seine beiden Komponenten Glukose und Gallussäure spaltet. Nach Koch (1922, S. 85) erträgt *Aspergillus* sehr hohe Konzentrationen der Tanninlösung; gelingt doch seine Kultur selbst noch in einer 50proz. Lösung.

Demgegenüber haben die Untersuchungen mit *Orcheomyces* ergeben, daß schon 4proz. Tanninlösungen das Wachstum hemmen. In 6- und mehrprozentigen Lösungen unterbleibt jegliche Myzelentwicklung. Dagegen erwiesen sich Konzentrationen von $^1/_2$—2% als günstig; das stärkste Wachstum erfolgte in einer 2proz. Lösung.

Nach Fernbach (1900, S. 1214) wird die Gerbsäure durch ein Enzym, die Tannase, zerlegt, mit Hilfe dessen offenbar auch *Orcheomyces Neottiae* imstande ist, Tannin in Gallussäure und Glukose zu spalten und letztere für seine Ernährung zu verwenden.

Aber auch Gallussäure kann dem Pilz als Kohlenstoffquelle dienen, wie schon die Kulturen 49, 51, 53 gezeigt haben. Besondere Versuche mit 2% Gallussäure haben ein mittelgutes Wachstum erzielt (vgl. auch Tab. 4).

2) Glukose und Lävulose.

Beide Zucker bilden in 2proz. Lösungen für *Orcheomyces Neottiae* gute Kohlenstoffquellen (siehe Fig. 7 u. 8).

3) Salep.

Mit Salep wurden deshalb Ernährungsversuche angestellt, weil er ein typischer Reservestoff der meisten Orchideenknollen ist. Nach Wehmer (1911, S. 166) enthält Salep: Stärke 27%, Eiweiß 15%, Zucker 1%, Asche 2% und Schleim 48%; dieser besteht

aus d-Mannose, Zellulose, Pentosanen und Mineralstoffen. In 1- und 2proz. Lösungen rief Salep eine viel üppigere Pilzentwicklung hervor, als alle anderen Nährmedien.

4) Inulin.

In 1proz. Lösungen erzeugte Inulin als Kohlenstoffquelle gute Myzelentwicklung, die derjenigen der Glukose ungefähr gleichkam.

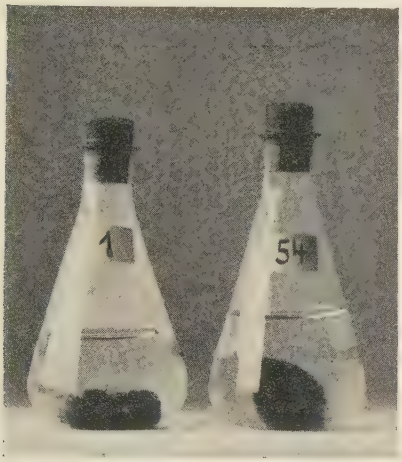

Fig. 7. *Orcheomyces Neottiae.* Glukosekultur Nr. 1, Lävulosekultur Nr. 54. Myzel braungrau.

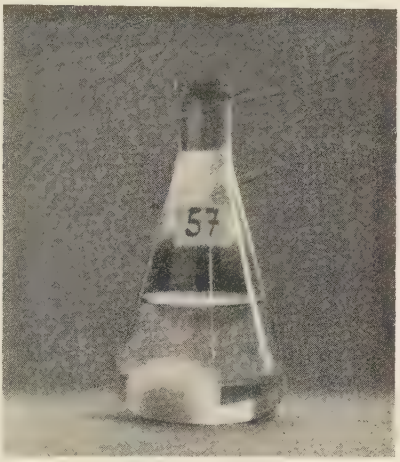

Fig. 8. *Orcheomyces Neottiae.* Lävulosekultur Nr. 57. Myzel weiß.

5) Arabinose und Xylose.

Fuchs und Ziegenspeck (1924, S. 199 ff.) haben festgestellt, daß unterirdische Teile von *Neottia* im Winter Fermente enthalten, welche aus Holzstoffen Pentosen freizumachen vermögen. Die Frage, ob der Pilz oder *Neottia* diese Fermente ausscheidet, wurde offen gelassen. Meine Untersuchungen haben wenigstens so viel ergeben, daß der Wurzelpilz in 1proz. Lösungen von Arabinose und Xylose gut wächst; er kann somit Pentosen als Kohlenstoffquellen verwerten.

6) Gummi arabicum.

Bei den Kulturen mit dem Pentosan Gummi arabicum fiel die besonders starke, schon nach wenigen Tagen einsetzende Entwicklung des Myzels auf, das bald die ganze Nährflüssigkeit erfüllte.

Bei längerer Kultur konnte keine weitere Pilzentwicklung beobachtet werden.

7) Zellulose.

Gereinigte Zellulose in fester Form ($^1/_2$ %) löste nur schwache Pilzentwicklung aus; diese hörte nach ca. 3 Wochen ganz auf. Deshalb muß Zellulose als eine für *Orcheomyces Neottiae* wenig brauchbare Kohlenstoffquelle betrachtet werden.

2. Stickstoffquellen.

Nachdem die Vorversuche gezeigt hatten, daß *Orcheomyces Neottiae* sich auch in N-freien Nährlösungen entwickeln kann, wurde bei der Untersuchung der Brauchbarkeit verschiedener Stickstoffquellen das Hauptgewicht auf die Prüfung der Assimilation des freien Stickstoffs der Luft gelegt. Die dabei zugegebenen anorganischen und organischen Stickstoffverbindungen hatten den Zweck, ihren eventuellen Einfluß auf die Bindung des Luftstickstoffs feststellen zu lassen.

Die Stickstoffanalysen wurden nach der Kjeldahlschen Methode teils titrimetrisch, teils kolorimetrisch nach Nessler vom Kantonschemiker von Basel-Stadt, Herrn Prof. H. Kreis, ausgeführt. Und zwar wurden anfänglich Nährlösung und Myzel zusammen, später jedoch getrennt analysiert. Die Zuckerbestimmungen erfolgten in der auf S. 14 angegebenen Weise.

a) Anorganische Stickstoffverbindungen.

Die Zugabe von Ammonsulfat und Kaliumnitrat förderte das Wachstum des Pilzes in der ersten Kulturwoche. Die Analysen ergaben ein großes Pilztrockengewicht und einen entsprechenden Mehrverbrauch an Kohlenstoffverbindungen (siehe Tab. 3, Kult. Nr. 110, 113, 116), sowie eine Zunahme des Stickstoffgehalts der Kultur; daraus folgt, daß *Orcheomyces Neottiae*, trotz der beigegebenen Stickstoffverbindungen, elementaren Stickstoff aus der Luft aufgenommen hatte (vgl. Tab. 4).

b) Organische Stickstoffverbindungen.

Bei den Vorversuchen war Glykokoll benützt worden; es begünstigte jedoch die Entwicklung des Pilzes nur dann, wenn die Kulturen nicht durchlüftet wurden. Salep, welcher, wie auf S. 18

mitgeteilt, 15% Eiweiß enthält, konnte dem Pilz als Stickstoffquelle dienen. Hier fiel wieder die rasche Myzelentwicklung in den ersten Kulturwochen auf. Auch ergaben die Analysen der Kulturen eine Zunahme an Stickstoff, welche wiederum die Assimilation von Luftstickstoff beweist (Tab. 4).

c) Elementarer Luftstickstoff.

Die Befähigung zur Assimilation elementaren Stickstoffs ist für Pilze schon mehrfach festgestellt worden (Ternetz, 1904 und 1907; Fröhlich, 1908; Stahel, 1911, u. a.). Für Wurzelpilze ist sie erst für *Phoma radicis Oxycocci*, *Andromedae*, *Tetralicis* und *Ericae* von Ternetz (1907), für *Phoma Betae* von Duggar and Davis (1916) und für den Endophyten von *Calluna vulgaris* von Rayner (1922) sichergestellt worden. Burgeff (1909, S. 34), Cortesi (1912) und Huber (1921, S. 325) haben bei der Prüfung ihrer Kulturen von verschiedenen Orchideenwurzelpilzen keine Bindung des Luftstickstoffs nachweisen können.

Die Ergebnisse meiner mit *Orcheomyces Neottiae* angestellten Versuche sind in Tabelle 4 und 5 zusammengestellt.

In diesen sind zunächst die mit kleinen Buchstaben (a, b, c usw.) bezeichneten Versuche von Bedeutung. Diese habe ich nicht geimpft, leitete jedoch durch ihre Nährlösungen ebenfalls einen Luftstrom durch, wie durch die beimpften Kulturen. Wie die Analysen ergaben, fand hier keine Zunahme an Stickstoffverbindungen statt. Wo dies in geimpften Kulturen der Fall ist, muß die Stickstoffzunahme auf der Tätigkeit des *Orcheomyces* beruhen.

Weiter veranschaulicht Tabelle 4 die Stickstoffassimilation im Zusammenhang mit dem Verbrauch an Tannin, Glukose und Lävulose.

Aus den Kulturen Nr. 110, 113, 116 geht hervor, daß eine Zugabe von organischen Stickstoffverbindungen die Assimilation des Luftstickstoffs durch *Orcheomyces Neottiae* nicht beeinflußt. Dadurch unterscheidet sich dieser von den durch Stahel (1911, S. 16) kultivierten Pilzen, bei denen ein Zusatz organischer Stickstoffverbindungen die Assimilation des atmosphärischen Stickstoffs förderte.

Aus Kolonne 7 ist der Stickstoffgewinn und aus Kolonne 4 der dazu gehörige Kohlenstoffverbrauch zu ersehen. Der Vergleich der Zahlen weist darauf hin, daß die verschiedenen Kohlenstoffquellen die Stickstoffbindung nur wenig beeinflussen, sind doch die Zahlen der Kolonne 7 nicht wesentlich verschieden. Interessant

ist das Ergebnis der Kultur Nr. 93, welche die vierfache Menge Nährlösung enthielt als andere Kulturen, jedoch nur eine doppelt so große Stickstoffbindung ergab.

Über die Ökonomie des Stoffwechsels gibt Kolonne 8 (Tab. 4) Aufschluß, in welcher der Stickstoffgewinn bezogen auf 1 g verbrauchter Glukose enthalten ist. Als Einheit habe ich Glukose gewählt, weil so die Werte der Tabelle 4 untereinander und mit denjenigen von Frl. Ternetz (1907, S. 388) verglichen werden können.

Der Glukosegehalt des von mir verwendeten chinesischen Tannins beträgt nach Widmer (1924, S. 32) ca. 12,5 %. Auf Grund dieser Angabe sind die Stickstoffzahlen der Kulturen Nr. 90, 93, 108—110 auf Glukose umgerechnet worden. (Die für die Kulturen Nr. 49, 51, 53 gefundenen Werte können nicht umgerechnet werden, weil der Pilz auch die bei der Spaltung des Tannins freigewordene Gallussäure verbraucht hat). Obwohl mit Hilfe dieser Berechnung nur Annäherungswerte gewonnen werden konnten, liefern diese immerhin gewisse Anhaltspunkte. Sie zeigen zunächst, daß Tannin von allen Kohlenstoffquellen am ökonomischsten verarbeitet wird, auch ökonomischer als Glukose und Lävulose. Diese Tatsache scheint darauf hinzuweisen, daß Tannin die natürliche Kohlenstoffquelle des Pilzes bildet.

Ein Vergleich mit der von Frl. Ternetz (1907, S. 388) zusammengestellten Tabelle ergibt ferner, daß *Orcheomyces Neottiae* weniger ökonomisch arbeitet als stickstoffbindende *Phoma*-Arten. Während nämlich Ternetz bei ihren aus Ericaceen isolierten Phomen bei einem Verbrauch von 1 g Glukose bis zu 22 mg Luftstickstoff erhielt, brachte es *Orcheomyces Neottiae* im Maximum auf 10,80 mg (Tab. 4, Nr. 108). Damit übertrifft er aber die wenig ökonomisch arbeitenden Formen: *Clostridium Pasteurianum* (1,22 mg), *Phoma rad. Ericae* (2,17 mg) und *Phoma rad. Tetralicis* (3,99 mg), und kommt in dieselbe Größenordnung zu stehen wie *Azotobacter chroococcum* (10,66 mg) und *Phoma rad. Andromedae* (10,92 mg).

Da aber für *Clostridium Pasteurianum* bekannt ist, daß bei reichlicher Zuckerzufuhr beträchtliche Mengen von Stickstoff gebunden werden, kann wohl auch *Orcheomyces Neottiae* unter den natürlichen Ernährungsbedingungen in der *Neottia*-Wurzel mit der Zeit eine beträchtliche Menge von Stickstoff binden, um so mehr, als seine Tätigkeit wohl nur kurze Zeit, d. h. während der kalten Wintermonate aussetzt, aber jedenfalls auch dann fortdauert, wenn die oberirdischen Teile der *Neottia* längst verdorrt sind.

Tabelle 5 enthält die Resultate der Kulturen mit Gallussäure, Inulin, Salep, Arabinose, Xylose, Gummi arabicum und Zellulose. Die Stickstoffzahlen sind hier nicht wesentlich verschieden von denjenigen der Tabelle 4; nur fallen die geringen Werte bei Gallussäure und Zellulose auf. Wichtig ist, daß auch hier die ursprünglich stickstoffhaltigen Nährlösungen auf die Intensität der Stickstoffbindung ohne Einfluß waren.

Tabelle 5.

Neottia-Pilz, Assimilation des atmosphärischen N.

Berechnet auf 100 mg Pilztrockengewicht und 100 Kulturtage. Verbrauch an C-Verbindungen nicht bestimmt.

Kultur-Nr.	Nährlösung cm^3	C-Quelle geboten ca. in mg	N-Gehalt der Kulturen Anfangs mg	N-Gehalt der Kulturen Ende mg	Luft-N Gewinn mg	pH Anfangs	pH Ende
		Gallussäure					
—	100	2000	0,0	0,0	0,0	nicht	nicht
1 NS	100	2000	0,0	0,21	0,21	bestimmt	bestimmt
		Inulin					
k	100	1000	0,0	0,0	0,0	5,0	5,0
85	100	1000	0,0	0,70	0,70	5,0	5,0
		Salep					
m	100	2000	4,60	4,60	0,00	5,22	5,22
129	100	2000	4,60	5,26	0,66	5,22	5,22
130	100	2000	4,60	5,24	0,64	5,22	5,20
131	100	2000	4,60	5,24	0,64	5,22	5,20
		Arabinose					
e	100	1000	0,0	0,0	0,0	4,4	4,4
81	100	1000	0,0	0,64	0,64	4,4	4,3
		Xylose					
f	100	1000	0,0	0,0	0,0	4,5	4,5
78	100	1000	0,0	0,50	0,50	4,5	4,5
		Gummi arabicum					
g	100	1000	2,63	2,63	0,0	4,5	4,5
75	100	1000	2,63	3,38	0,75	4,5	4,5
		Zellulose					
h	100	250	0,0	0,0	0,0	4,7	4,7
87	100	250	0,0	0,12	0,12	4,7	4,8

Über die Speicherung des aufgenommenen Stickstoffs gibt Tabelle 6 Aufschluß. Aus ihr ist zu ersehen, daß der Stickstoff,

außer bei Kultur Nr. 50, in welcher 0,06 mg in der Flüssigkeit enthalten war, im Myzel behalten und nicht in die Nährlösung abgegeben worden ist.

Tabelle 6.

Neottia-Pilz, Speicherung des assimilierten Luft-N.

Kultur-Nr.	Kultur-dauer	Kolben-inhalt cm^3	C-Quelle 2 %	N-Gehalt vor der Kultur	N-Gehalt nach der Kultur	
					der Flüssigkeit	des Myzels
50	55 Tage	100	Tannin	0,0	0,06	0,19
54	60 „	100	Lävulose	0,0	0,00	0,15
55	55 „	100	„	0,0	0,00	0,11

Abschnitt IV.

Die Wurzelpilze einiger grüner Orchideen.

Nachdem die Kultur mit *Orcheomyces Neottiae* gelungen war und die Untersuchungen über die Ernährung, besonders über die Assimilation des Luftstickstoffs, unerwartete Resultate ergeben hatten, versuchte ich die Wurzelpilze grüner einheimischer Orchideen zu kultivieren. Denn es war wünschenswert, einerseits für die Beurteilung der morphologischen Verhältnisse des *Orcheomyces Neottiae* Vergleichsmaterial zu bekommen und andererseits die negativen Resultate früherer Forscher über die Assimilation des Stickstoffs der Luft nachzuprüfen.

Ich wählte zunächst *Gymnadenia conopea* und *Orchis maculatus*, deren Pilze schon von Burgeff (1909, S. 24) kultiviert und beschrieben worden sind. Später sammelte ich *Helleborine palustris* und *latifolia*, deren Wurzelpilze meines Wissens noch nicht untersucht worden waren.

1. Die Kultur.

Die Isolierung dieser Wurzelpilze erfolgte auf dieselbe Weise, wie dies für *Orcheomyces Neottiae* auf S. 7 ff. beschrieben wurde. Auch die Kulturmethode war dieselbe; ich verwendete hauptsächlich durchlüftete stickstofffreie Nährlösungen mit Tannin, Glukose und Lävulose. In diesen entwickelten sich alle vier Pilze gut.

2. Die Morphologie.

Das Wachstum und die Differenzierung des Myzels sind von den bis jetzt bekannten Orchideenwurzelpilzen nicht verschieden. Alle vier Pilze wachsen innerhalb der Nährflüssigkeit. Sie bilden die charakteristischen Konidienketten, gehören somit zu den Orcheomyceten.

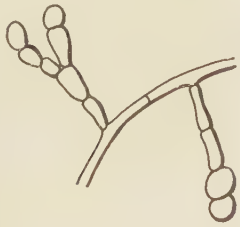

Fig. 9.
Orcheomyces conopeae.
Tanninkultur, Konidienketten in der Nährflüssigkeit gebildet.
Vergr. 240.

Fig. 10.
Orcheomyces maculati.
Tanninkultur, Konidienketten in der Nährflüssigkeit gebildet.
Vergr. 240.

Fig. 11.
Orcheomyces Helleborines palustris.
Tanninkultur, Konidienketten in der Nährflüssigkeit gebildet. Vergr. 240.

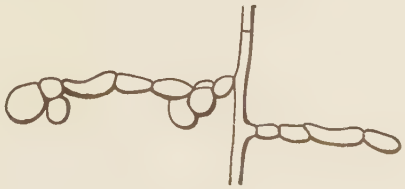

Fig. 12.
Orcheomyces Helleborines latifoliae.
Tanninkultur, Konidienketten in der Nährflüssigkeit gebildet. Vergr. 240.

Orcheomyces conopeae hatte Burgeff in seine Gruppe: *Orcheomyces apiferae* eingereiht. Die von mir neu kultivierten Pilze: *Orcheomyces Helleborines palustris* und *Orcheomyces Helleborines latifoliae* können ebenfalls dieser Gruppe zugeteilt werden. *Orcheomyces maculati* hingegen muß, der Gestaltung der Hyphen und der Konidien wegen, in einer besonderen Gruppe untergebracht werden, wie dies schon Burgeff (1909, S. 27) getan hat.

Als spezielle Merkmale sind anzuführen, bei

a) *Orcheomyces conopeae*:

die kurzen meist braun gefärbten Sporenketten (Fig. 9),

b) *Orcheomyces maculati*:

die, im Vergleich zu anderen Pilzen, dickeren Hyphen von ca. 10 μ und die nicht verzweigten Ketten kugeliger Konidien (Fig. 10),

c) *Orcheomyces Helleborines palustris:*

die 5 μ dicken Hyphen, deren Glieder ca. 100 μ lang sind, sowie die kugelige Form der Konidien (Fig. 11),

d) *Orcheomyces Helleborines latifoliae:*

zeigt dieselben Hyphenausmaße wie c, nur ist die Form der Sporen variabel, nämlich länglich bis rund (Fig. 12).

3. Die Ernährung.

Als Kohlenstoffquellen wurden Glukose, Lävulose und Tannin verwendet, welche von allen vier Pilzen gleich gut verarbeitet wurden. Die günstige Pilzentwicklung in Tannin weist darauf hin, daß auch diese Pilze Tannin offenbar zu spalten vermögen. Die Untersuchung der Hyphen aus jungen Kulturen ergab öfters Glykogen, die von älteren Kulturen Tropfen eines fetten Öls.

In bezug auf die Stickstoffquelle wurden diese vier Orcheomyceten nur darauf untersucht, ob auch sie der Assimilation des freien Luftstickstoffs fähig seien.

Tabelle 7.

Pilze grüner Orchideen. Assimilation des atmosphärischen N. Bezogen auf 100 mg Pilztrockengewicht, 100 Kulturtage, in 100 cm^3 Nährlösung.

Kultur-Nr.	*Orcheomyces*	Tannin in mg		Assimilation des Luft-N	
		geboten ca.	verbraucht	in mg	pro 1 g verbrauchter Glukose
60	*conopeae*	2000	796,7	0,97	9,76
61	*maculati*	2000	687,9	0,60	6,88
62	*Helleborines palustris*	2000	693,5	0,62	7,04
63	„ *latifoliae*	2000	978,4	0,66	5,36

Die Resultate dieser Versuche sind in Tabelle 7 enthalten, welche neben dem Verbrauch an Tannin auch die Menge des gebundenen elementaren Stickstoffs angibt. Vergleichen wir die hier

erhaltenen Zahlen für Tanninverbrauch und Stickstoffassimilation mit denjenigen von *Orcheomyces Neottiae* in Tabelle 4, so finden wir keine wesentlichen Unterschiede. Alle vier Pilze sind demnach in gleicher Weise befähigt, den elementaren Stickstoff der Luft zu binden und die vorhandenen Kohlenstoffquellen ebenso ökonomisch zu verwerten.

Mit dem Ergebnis, daß nicht nur *Orcheomyces Neottiae*, sondern auch *Orcheomyces conopeae*, *O. maculati*, *O. Helleborines palustris* und *O. H. latifoliae* imstande sind, den atmosphärischen Stickstoff zu assimilieren und für ihren Stickstoffwechsel zu verwenden, wird die Physiologie der Ernährung auch dieser grünen Orchideen in ein neues Licht gerückt.

Abschnitt V.

Allgemeine Betrachtungen.

In seiner umfassenden Arbeit über die Wurzelpilze der Orchideen hat Burgeff (1909) die bis dahin von verschiedenen Forschern aufgestellten Theorien über die Ernährung der Orchideen zusammengestellt und unter Verwendung seiner eigenen Resultate kritisch betrachtet. Dabei wurde auch *Neottia*, über welche schon damals eine Fülle von Literatur erschienen war, in die Diskussion einbezogen. Es ist deshalb wohl unnötig, eine Besprechung aller früher für möglich gehaltenen Ernährungsweisen hier folgen zu lassen.

Der Mangel an Verbindungen des Wurzelpilzes der *Neottia* mit dem Boden hat einer Erklärung der Ernährungsweise dieser Orchidee von jeher Schwierigkeiten bereitet. Ob Wurzeln von Phanerogamen imstande sind, kompliziert gebaute Humusstoffe zu spalten und aufzunehmen, ist bis heute nicht bekannt; hingegen wissen wir, daß die Pilze hierzu in großem Maße befähigt sind.

Deshalb versuchte Burgeff die Magnussche Hypothese über die Aufnahme der Bodensubstanzen folgendermaßen zu erweitern: „Wollen wir sie (die Aufnahme) erklären, so müssen wir der Absorption der Bodenstoffe außerhalb der Pflanze eine Löslichmachung vorhergehen lassen. Vermochte der Endophyt nicht außerhalb der Wurzel tätig zu sein, so vermögen es vielleicht seine Fermente."

Durch die bis jetzt gewonnenen Resultate hat die Burgeffsche Erklärungsweise manche Stütze erhalten. Haben doch Fuchs und Ziegenspeck (1924) in Rhizom und Wurzeln von *Neottia*

Fermente nachgewiesen, welche aus den Humussubstanzen Hexosen, Pentosen und Pentosane zu lösen vermögen. Dieselben Fermente wurden auch im Boden in der Umgebung der *Neottia* nachgewiesen. Meine Untersuchungen haben nun ergeben, daß nicht nur Hexosen und Pentosen, sondern auch die im Humus sehr zahlreich vorhandenen Pentosane (Pringsheim, 1923, S. 184) sowie Glukoside (Tannin) vom Pilz als gute Kohlenstoffquellen verarbeitet werden können. Solange jedoch nicht nachgewiesen ist, daß *Neottia* nicht auch solche Enzyme zu bilden vermag, kann nicht entschieden werden, ob der Wurzelpilz oder die Phanerogame den Hauptanteil an der Spaltung der organischen Verbindungen des Bodens hat. Vielleicht werden aber Tannin und andere hochmolekulare Verbindungen als solche von *Neottia* aus dem Boden aufgenommen und dann erst durch den Pilz zu Kohlehydraten gespalten. Sollten diese nur vom Pilz aufgenommen und zu Glykogen verarbeitet werden, so fallen sie bei der Verdauung des Pilzes durch *Neottia* dieser doch anheim; letztere profitiert also auch dann von der Kohlenstoffaufnahme des Pilzes. Fuchs und Ziegenspeck (1924) haben nun nachgewiesen, daß *Neottia* während ihres unterirdischen Lebens im Winter, also zu einer Zeit, da für diese Orchidee jegliche Kohlensäureassimilation ausgeschlossen ist, eine Zunahme an Kohlenstoffverbindungen zu verzeichnen hat; diese können natürlich nur von aus dem Boden stammenden Kohlenstoffverbindungen herrühren. Während wir nicht wissen, ob diese vom Pilz oder von der Phanerogame gespalten und aufgenommen werden, ist es wohl sicher, daß die Stickstoffverbindungen, welche der Pilz bildet, bei dessen Verdauung der *Neottia* anheimfallen und zwar wohl vorwiegend in Form von eiweißartigen Körpern. In dieser Beziehung scheint wenigstens *Neottia* vom Pilz absolut abhängig zu sein, da bis jetzt noch für keine Phanerogame eine Bindung atmosphärischen Stickstoffs nachgewiesen wurde.

Während bei *Neottia* die geringe Kohlensäureassimilation ihrer oberirdischen Organe durch die Aufnahme von Kohlenstoffverbindungen aus dem Boden resp. aus dem Pilz ersetzt werden muß, scheint dies bei den grünen Orchideen in weit geringerem Maße nötig zu sein. Die Fähigkeit zur Bindung von Stickstoff der Luft, welche ihren Wurzelpilzen zukommt, erlaubt ihnen jedoch auf mageren stickstoffarmen Böden zu gedeihen, zu welchen möglicherweise auch die Baumrinden gehören, auf welchen viele tropische Orchideen epiphytisch wachsen, obwohl für deren Wurzelpilze bis jetzt wenigstens

keine Stickstoffassimilation nachgewiesen worden ist. Auf Grund dieser Befunde sind die von mir untersuchten Orchideen in dieselbe biologische Gruppe zu stellen wie die Leguminosen und Ericaceen. Während aber erstere ihren Gesamtbedarf an Kohlenstoffverbindungen durch ihre Assimilation der Kohlensäure decken und nur den gebundenen Stickstoff von ihren Knöllchenbakterien beziehen, haben sich die Orchideen, wie vielleicht auch einige Ericales (z. B. *Monotropa Hypopitys*) und *Lycopodium*-Prothallien die Fähigkeit ihrer endotrophen *Mycorrhiza* zur Abspaltung von Zucker aus hochmolekularen Verbindungen zunutze gemacht und sind, die einen in stärkerem, die anderen in geringerem Maße, zur saprophytischen resp. parasitischen Lebensweise übergegangen und haben ihren Chlorophyllapparat entsprechend reduziert.

Obwohl das nächste Ziel dieser Arbeit, die Physiologie des Wurzelpilzes von *Neottia Nidus avis* zu studieren, wenigstens zum Teil erreicht worden ist, konnte ich lange nicht alle Fragen beantworten, die sich mir bei meinen Untersuchungen aufgedrängt haben, besonders nicht die Klarlegung der Physiologie der pilzfreien Orchidee, wie dies Rayner bei *Calluna* gelungen ist. Ich hoffe, in absehbarer Zeit meine Arbeit in dieser Richtung ergänzen und auf andere *Mycorrhiza*-Pflanzen ausdehnen zu können.

Abschnitt VI.

Zusammenfassung.

1. Kultur: Der Wurzelpilz von *Neottia Nidus avis* Rich. läßt sich nach gründlicher Sterilisation der Wurzel mit Alkohol in flüssigen Nährmedien aus der Wurzel heraus züchten. Das Myzel bleibt fast immer untergetaucht; nur selten entstehen Lufthyphen und Sporenketten an der Oberfläche der Nährflüssigkeit (S. 6—13).

Die von Burgeff (1909) isolierten Pilze von *Gymnadenia conopea* R. Br. und *Orchis maculatus* L., sowie die bisher nicht kultivierten Pilze von *Helleborine palustris* Schrank und *Helleborine latifolia* Druce, sind nach derselben Methode gezüchtet worden (S. 24).

2. Morphologie: Die Myzelien aller genannten Wurzelpilze sind in Lang- und Kurzhyphen differenziert; letztere sind meist als Konidienketten ausgebildet. Aus diesem Grunde gehören auch die neu kultivierten Wurzelpilze von *Helleborine palustris*

und *latifolia* zur Gattung *Orcheomyces* (Burgeff) = *Rhizoctonia* (Bernard) und wurden als *Orcheomyces Neottiae* (S. 3—6), *Orcheomyces Helleborines palustris* und *O. H. latifoliae* (S. 25) bezeichnet.

3. Stoffwechsel: *Orcheomyces Neottiae* ist aërob und bevorzugt saure Lösungen, welche ein pH 5,2—3,3 aufweisen (S. 13).

In Reinkultur verarbeitet der Pilz hauptsächlich Glukoside (z. B. Tannin), Polysaccharide, Hexosen, Pentosen und Pentosane (z. B. Gummi arabicum) (S. 13—20).

An anorganischen Stickstoffverbindungen benützt er Kaliumnitrat und Ammonsulfat, an organischen Stickstoffverbindungen Glykokoll, Hämoglobin und das in Salep enthaltene Eiweiß.

Seine Befähigung zur Bindung elementaren Stickstoffs aus der Luft wurde quantitativ nachgewiesen. Die Zugabe von Stickstoffverbindungen beeinflußte nur die Entwicklung des Pilzes, dessen Stickstoffassimilation aus der Luft dagegen nicht (S. 20—24).

Orcheomyces conopeae, *O. maculati*, *O. Helleborines palustris* und *O. H. latifoliae* benötigen zum Leben ebenfalls Sauerstoff und saure Nährlösungen. Sie verarbeiten Glukoside (Tannin) und Hexosen; auch sie sind befähigt, atmosphärischen Stickstoff zu binden (S. 26).

Als Stoffwechselprodukt wurde bei allen untersuchten Pilzen in jungen Kulturen Glykogen, in alten ein fettes Öl nachgewiesen (S. 17 und 26).

4. Physiologische Leistung von Wurzelpilz und Orchidee: Außer ihrer Fähigkeit, den atmosphärischen Stickstoff zu binden, vermögen die Wurzelpilze der von mir untersuchten Orchideen auch aus hochmolekularen organischen Verbindungen, die in Humusböden enthalten sind (Pentosane, Glukoside, z. B. Tannin) reduzierende Zucker abzuspalten und davon zu leben. Nun scheinen sich die grünen Orchideen (z. B. *Orchis maculatus*, *Gymnadenia conopea*, *Helleborine palustris* und *latifolia*) darauf zu beschränken, von ihren Mycorrhizen den gebundenen Stickstoff zu beziehen, was sie befähigt, in salzarmen Böden zu gedeihen. Ob sie von ihrer *Mycorrhiza* auch reduzierende Zucker erhalten und dementsprechend ihre Kohlensäureassimilation wenigstens teilweise reduziert haben, müssen weitere Untersuchungen zeigen. Bei *Neottia* ist dies zweifellos der Fall, indem sie trotz geringer Kohlensäureassimilation sehr viel Stärke bildet. Bei den fast oder ganz chlorophyllfreien Orchideen wie *Coralliorrhiza* und *Epipogon* scheint die Abhängigkeit

der Orchidee von ihrem *Mycorrhiza*-Pilz das Extrem erreicht zu haben. *Neottia* bildet darum wahrscheinlich ein Zwischenglied zwischen diesen farblosen und den rein grünen Orchideen. Diese gehören auf Grund ihrer Ernährungsverhältnisse in dieselbe biologische Gruppe wie die Leguminosen, die Rubiaceen *Pavetta* und *Ardisia*, sowie die Ericaceen.

Literaturverzeichnis.

1924. Benecke, W. und Jost, L., Pflanzenphysiologie. Bd. 1, Stoffwechsel: *Mycorrhiza*, S. 404—410. Jena, G. Fischer.

1899. Bernard, N., Sur la germination du *Neottia Nidus avis*. C. R. Acad. Paris, Bd. 128, p. 1253—1255.

1904. — —, Le champignon endophyte des Orchidées. Ibidem, Bd. 138, p. 828—830.

1905. — —, Nouvelles espèces d'endophytes d'Orchidées. Ibidem, Bd. 140, p. 1272 bis 1273.

1906. — —, Symbiose d'Orchidées et de divers champignons. Ibidem, Bd. 142, p. 52—54.

1909. — —, L'évolution dans la symbiose. Annales des Sciences naturelles, Bot., 9. Sér., Bd. 9, p. 1—196.

1909. Burgeff, H., Die Wurzelpilze der Orchideen. Jena, G. Fischer. Mit Literaturverzeichnis.

1911. — —, Die Anzucht tropischer Orchideen aus Samen, Jena, G. Fischer.

1896. Chodat, R. et Lendner, A., Sur les mycorrhizes du *Listera cordata*. Bulletin de l'Herbier Boissier, Bd. 4, p. 265—272.

1912. Cortesi, F., Sulle micorize endotrofiche con particolare riguardo a quelle delle Orchidaceae. Atti della società ital. Roma, 1912, p. 860—864.

1920. Costantin, J. et Dufour, L., Sur la biologie du *Goodyera repens*. Revue générale de Botanique, Bd. 32, p. 529—533.

1922. — — et Magrou, J., Applications industrielles d'une grande découverte française. Annales des Sciences naturelles. Bot., 10. Sér., Bd. 4, p. 1—34.

1896. Czapek, F., Zur Lehre von Wurzelausscheidungen. Jahrb. f. wiss. Bot., Bd. 29. S. 321—390.

1920. — —, Biochemie der Pflanzen. Bd. 1, S. 240 ff. Jena, G. Fischer.

1913. Dekker, J., Die Gerbstoffe. Bot.-chem. Monographie der Tannide. Berlin, Gebr. Borntraeger.

1873. Drude, O., Die Biologie von *Monotropa Hypopitys* und *Neottia Nidus avis*. Von der Philos. Fakultät zu Göttingen gekrönte Preisschrift. Göttingen, Dieterich.

1916. Duggar, B. M. and Davis, A. R., Studies in the Physiology of the Fungi. I. Nitrogen Fixation. Annals of the Missouri Bot. Garden, Bd. 3, p. 413 bis 437.

1879. Eidam, E., Über Pilzentwicklung in den Wurzeln der Orchidaceen. Jahresber. d. Schles. Ges. f. vaterländische Kultur, Bd. 57, S. 297.

1909. Fernbach, A., Sur la tannase. C. R. Acad. Sc. Paris, Bd. 131, p. 1214.

1888. Frank, B., Über die physiologische Bedeutung der *Mycorrhiza*. Ber. d. Deutsch Bot. Ges., Bd. 6, S. 248—269.

1891. — —, Über die auf Verdauung von Pilzen abzielende Symbiose der mit endotrophen Mycorrhizen begabten Pflanzen, sowie der Leguminosen und Erlen. Ebenda, Bd. 9, S. 244—253.

1908. Fröhlich, H., Stickstoffbindung durch einige auf abgestorbenen Pflanzen häufige Hymenomyceten. Jahrb. f. wiss. Bot., Bd. 45, S. 257—302.

1922. Fuchs, A. und Ziegenspeck, H., Aus der Monographie des *Orchis Traunsteineri* Saut. 1. Bot. Arch., Bd. 2, S. 238—248.

1923. — — und — —, 2. *Mycorrhiza* und Boden. Ebenda, Bd. 3, S. 237—261.

1924. — — und — —, 3. Entwicklungsgeschichte einiger deutscher Orchideen. Ebenda, Bd. 5, S. 120—132.

1924. — — und — —, 5. Die Pilzverdauung der Orchideen. Ebenda, Bd. 6, S. 193—206.

1925. — — und — —, Bau und Form der Wurzeln der einheimischen Orchideen im Hinblick auf ihre Aufgabe. Ebenda, Bd. 12, S. 290—379.

1926. — — und — —, Entwicklungsgeschichte der Achsen der einheimischen Orchideen und ihre Physiologie und Biologie. 1. *Cypripedium, Helleborine, Limodorum* und *Cephalanthera*. Ebenda, Bd. 14, S. 165—260.

1904. Gallaud, J., De la place systématique des endophytes d'Orchidées. C. R. Acad. Sc. Paris, Bd. 138, p. 513—515.

1901. Green, J. R., Die Enzyme. (Deutsch von W. Windisch.) Berlin, P. Parey.

1905. Gutbier, A., Die gewichtsanalytische Bestimmung der Salpetersäure mittels Nitron nach Busch. Ref. Chem. Centralbl., Bd. 76, S. 1274.

1925. Henrici, M. und Senn, G., Chromatophoren und Kohlensäureassimilation nichtgrüner Gefäßpflanzen. Ber. d. Schweiz. Bot. Ges., Heft 34, S. 110—141.

1921. Huber, B., Zur Biologie der Torfmoororchidee *Liparis Loeselii*. Sitzungsber. d. Wiener Akad. d. Wiss., Bd. 130, Abt. 1, S. 307—328.

1876. Irmisch, Einige Bemerkungen über *Neottia Nidus avis* L. und einige andere Orchideen. Jahresber. d. naturwiss. Vereins zu Bremen, Bd. 5, S. 503—509.

1899. Jennings, A. V. and Hanna, H., *Coralliorrhiza innata* and its *Mycorrhiza*. The Proceedings of the Royal Dublin Society, N. S., Bd. 9, p. 1—11.

1913. Klein, R., Über Nachweis und Vorkommen von Nitraten und Nitriten in Pflanzen. Beihefte z. Bot. Centralbl., Bd. 30, 1, S. 141.

1925. Knudson, L., Physiological study of the symbiotic germination of Orchid seeds. Botanical Gazette, Bd. 79, p. 345—379.

1922. Koch, A., Mikrobiologisches Praktikum. Berlin, J. Springer.

1904. Lippmann, E. von, Die Chemie der Zuckerarten. Braunschweig, Fr. Vieweg und Sohn.

1912. Lutz, L., Comparaison de l'azote total et de l'azote nitrique dans les plantes parasites et saprophytes. C. R. Acad. Sc. Paris, Bd. 154, p. 1247—1249.

1898. MacDougal, D. T., Titles of literature concerning the fixation of free nitrogen by plants. Minnesota Botanical Studies, Bd. 1. p. 186—221.

1899. — —, Symbiosis and Saprophytism. Botanical Gazette, Bd. 1, p. 220—222.

1900. Magnus, W., Studien an der endotrophen *Mycorrhiza* von *Neottia Nidus avis*. Jahrb. f. wiss. Bot., Bd. 35, S. 205—268.

1911. — —, *Mycorrhiza*. Botan. Wandtafeln mit erläuterndem Text von L. Kny. Abt. 13, Tafeln 116 u. 117, S. 525—551.

1902. Marcuse, M., Anatomisch-biologischer Beitrag zur Mycorrhizenfrage. Diss. Jena.
1923. Melin, E., Experimentelle Untersuchungen über die Konstitution und Ökologie der Mycorrhizen von *Pinus silvestris* L. und *Picea Abies* L. Mykologische Untersuchungen und Berichte, Bd. 2, S. 73—331. Mit Literaturverzeichnis.
1925. — —, Untersuchungen über die Bedeutung der Baum-*Mycorrhiza*. Eine ökologisch-physiologische Studie. 125 S. mit Literaturverzeichnis. Jena, G. Fischer.
1924. Michel-Durand, De l'état des tannins dans la cellule végétale. C. R. Acad. Sc. Paris, Bd. 178, 1, p. 586—589.
1884. Mollberg, A., Untersuchungen über die Pilze in den Wurzeln der Orchideen. Jenaer Zeitschrift, Bd. 17, S. 519—536.
1906. Peklo, J., Zur Lebensgeschichte von *Neottia Nidus avis* L. Flora, Bd. 96, S. 260—275.
1903. Petri, L., Ricerche sul significato morfologico e fisiologico dei prosporoidi (sporangioli di Janse) nelle micorize endotrofiche. Nuovo giornale botanico italiano, Bd. 10, S. 541—562.
1923. Peyronel, B., Fructifications de l'endophyte à arbuscules et á vésicules des mycorhizes endotrophes. Bulletins Soc. Mycol. de France, Bd. 39, S. 119 bis 126.
1924. — —, Prime ricerche sulle micorize endotrofiche e sulla micoflora radicicola normale delle fanerogame. Rivista di Biologia, Bd. 5, p. 61.
1856. Prillieux, E., De la structure anatomique et du mode de végétation de *Neottia Nidus avis*. Annales d. Sciences naturelles, Bot., 4. Sér., Bd. 5, p. 267—282.
1923. Pringsheim, H., Die Polysaccharide. Berlin, J. Springer.
1922. Rayner, M. C., Nitrogen Fixation in *Ericaceae*. Botanical Gazette, Bd. 73, p. 226—235.
1925. — —, The Nutrition of *Mycorrhiza* plants: *Calluna vulgaris*. The British Journal of Experimental Biology, Bd. 2, S. 265—292.
1846. Reisseck, war mir nicht zugänglich, zitiert nach Schacht.
1914. Rosenthaler, L., Der Nachweis organischer Verbindungen. Stuttgart, F. Enke.
1923. — —, Grundzüge der chemischen Pflanzenuntersuchung. Berlin, J. Springer.
1854. Schacht, H., Pilzfäden im Innern der Zellen und der Stärkemehlkörner. Monatsbericht über d. Verhandl. d. preuß. Akad. d. Wiss. Berlin, S. 377—384.
1910. Schatz, W., Beiträge zur Biologie der Mycorrhizen. Diss. Jena.
1849. Schleiden, M. J., Grundzüge der wissenschaftl. Botanik. Leipzig, W. Engelmann. II. Kap., 1. Abschn. IV. Gestaltung der assimilierten Stoffe.
1907. Senn, G., Les Chromatophores de quelques plantes vasculaires dépourvues de Chlorophylle. Archives d. Sc. phys. et nat. Genève, Bd. 24, p. 499.
1908. — —, Die Gestalts- und Lageveränderungen der Pflanzen-Chromatophoren. Leipzig, W. Engelmann.
1925. — —, Siehe Henrici und Senn.
1911. Stahel, G., Stickstoffbindung durch Pilze bei gleichzeitiger Ernährung mit gebundenem Stickstoff. Jahrb. f. wiss. Bot., Bd. 49, S. 1—37.
1900. Stahl, E., Der Sinn der Mycorrhizenbildung. Jahrb. f. wiss. Bot., Bd. 34, S. 539—668.
1920. — —, Zur Physiologie und Biologie der Exkrete. Flora, Bd. 113, S. 1—132.
1867. Tieghem, Ph. van, Recherches pour servir à l'histoire physiologique des Mucédinées. Fermentation Gallique. Annales d. Sciences naturelles, Bot., Ser. 5, Bd. 8, p. 210—244.

1904. Ternetz, Ch., Assimilation des atmosphärischen Stickstoffs durch einen torfbewohnenden Pilz. Ber. d. Deutsch. Bot. Ges., Bd. 22, S. 267—274.
1907. — —, Über die Assimilation des atmosphärischen Stickstoffs durch Pilze. Jahrb. f. wiss. Bot., Bd. 44, S. 353—408.
1923. Treadwell, W. D., Kurzes Lehrbuch der Analytischen Chemie. 2 Bde. Leipzig und Wien, F. Deuticke.
1886. Wahrlich, W., Beitrag zur Kenntnis der Orchideenwurzelpilze. Bot. Ztg., S. 481—488 und S. 497—505.
1920. Weber, F., Notiz zur Kohlensäureassimilation von *Neottia*. Ber. d. Deutsch. Bot. Ges., Bd. 38, S. 233—242.
1911. Wehmer, C., Die Pflanzenstoffe. Jena, G. Fischer.
1904. Weiss, F. E., A *Mycorrhiza* from the Lower Coal-Measures. Annals of Botany, Bd. 18, S. 255—265.
1912. Weyland, H., Zur Ernährungsphysiologie mycotropher Pflanzen. Jahrb. f. wiss. Bot., Bd. 51, S. 1—79.
1924. Widmer, R., Zur Kenntnis des türkischen Tannins. Diss. Zürich.
1873. Wiesner, J., Untersuchungen über die Farbstoffe einiger für chlorophyllfrei gehaltenen Phanerogamen. Jahrb. f. wiss. Bot.. Bd. 8, S. 475—594.
1921. Willstätter, R. und Csànyi, W., Zur Kenntnis des Emulsins. Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. 117, S. 172—200.
1925. Wolff, Hch., Zur Physiologie des Wurzelpilzes von *Neottia Nidus avis* L. Verhandl. d. Schweiz. Naturf. Ges, 106. Jahresversammlung Aarau, 2. Teil. S. 155.
1923. Wolff, J., Contribution à la connaissance des phénomènes de symbiose chez les orchidées. C. R. Acad. Sc. Paris, Bd. 177, S. 554.
907. Zellner, J., Die Chemie der höheren Pilze. Leipzig, W. Engelmann.
1914. — —, Zur Chemie heterotropher Phanerogamen. Monatsh. f. Chem., Bd 35, S. 333—374.
1919. — —, Zur Chemie heterotropher Phanerogamen. Ebenda, Bd. 40, S. 293—311.
1923. — —, Die Symbiose der Pflanze als chemisches Problem. 2. Teil. Beihefte z. Bot. Centralbl., Bd. 40, 1. Abt., S. 1—13.
1922. Ziegenspeck, H., Lassen sich Beziehungen zwischen dem Gehalte an Basen in der Asche und dem Stickstoffgehalte der Pflanzen aufstellen, die einen Rückschluß auf die Ernährungsart und die Exkretion gestatten? Ber. d. Deutsch. Bot. Ges., Bd. 40, S. 78—85.

Vita

Als Sohn des Kaufmanns Heinrich Wolff, von Basel, und Pauline Wolff geb. Lautenschlager, bin ich, Heinrich Karl Wolff am 6. September 1898 in Basel geboren. Daselbst trat ich 1910 in die Realschule ein und verließ sie wieder im Herbst 1919 mit dem Zeugnis der Reife. Ich studierte Naturwissenschaften und Geographie an der Universität Basel. Vom Herbst 1922 bis Frühjahr 1925 bekleidete ich die Assistentenstelle am dortigen botanischen Institut.

Die vorliegende Dissertation ist entstanden unter der Leitung von Herrn Professor G. Senn, Direktor der Botanischen Anstalt.

Während meiner Studienzeit besuchte ich die Vorlesungen und Kurse folgender Herren Professoren und Dozenten:

A. Buxtorf, E. Faust, F. Fichter, E. Handschin, H. Hassinger, R. Menzel, I. T. Saunders, O. Schüepp, G. Senn, K. Spiro, F. E. Weiß, E. Witschi und F. Zschokke.